

本 国 特 許
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月 4日

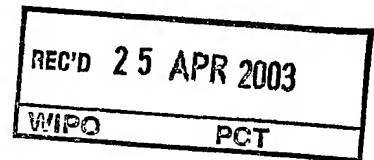
出 願 番 号

Application Number:

特願2002-057909

[ST.10/C]:

[JP2002-057909]



出 願 人

Applicant(s):

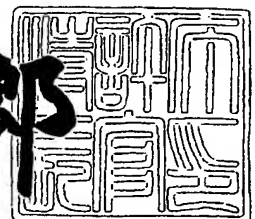
科学技術振興事業団

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 8日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3024258

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02085-SH

【提出日】 平成14年 3月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07H 15/00
C07H 19/00
C07H 21/00

【発明の名称】 新規分岐状シアロ糖分子とそれを用いた
抗ウィルス剤

【請求項の数】 4

【発明者】
【住所又は居所】 静岡県静岡市瀬名1丁目8番3-102
【氏名】 鈴木 康夫

【発明者】
【住所又は居所】 静岡県清水市川原町21-11-402
【氏名】 左 一八

【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009911
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

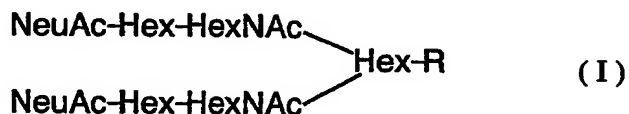
【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規分岐状シアロ糖分子とそれを用いた抗ウィルス剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式 (I)

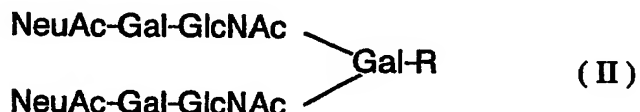
【化1】



(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

【請求項2】 次式 (II)

【化2】

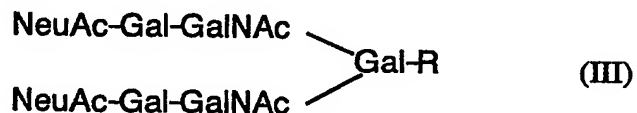


(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Galはガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)

で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

【請求項3】 次式 (III)

【化3】



(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Galはガラクトース、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タ

ンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)

で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子。

【請求項4】 少なくとも請求項1ないし3のいずれかの新規分岐状シアロ糖分子を有効成分として含有することを特徴とする抗ウィルス剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、新規分岐状シアロ糖分子に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、インフルエンザウィルスの宿主域の変異や抗原性の変異に対応でき、すべてのヒトおよび動物由来のA型インフルエンザウィルスおよびB型インフルエンザウィルスの感染を阻止できる医薬品やウィルス除去用フィルター等の吸着剤として有用な新規分岐状シアロ糖分子に関するものである。

【0002】

【従来技術とその課題】

日本におけるインフルエンザ感染者は、毎年数10万人～100万人を超える。1918年のスペイン風邪（遺伝子解析によりH1N1型インフルエンザウィルスによることが判明）は、世界で年間に少なくとも2000万人、日本でも38万人以上を死亡させ、人類史上最悪、最大の自然災害と位置付けられている。

【0003】

また、近年では、インフルエンザが特に高齢者においては気管支炎や肺炎を併発して重症化させ、小児においては脳炎や脳症を引き起こすことなどが報告されており、冬季における疾患の制圧は世界的に急務となっている。

【0004】

インフルエンザの病原体は、インフルエンザウィルスであり、インフルエンザウィルスには内部タンパク質の抗原性の違いによりA、B、C型の3種類が知られている。B、C型は主にヒトから分離されるが、A型ウィルスは、ヒト以外にも野生水鳥、家禽類、ブタ、ウマ、アザラシ、クジラ、フェレットなど自然界の多くの動物種から分離され、最も病原性が高く、世界的流行を起こしている。

【0005】

インフルエンザウイルスは、分節状の単鎖RNAをゲノムとする。1本鎖RNAの配列を読み取るRNAポリメラーゼによる複製は、通常の2本鎖DNAを読み取るDNAポリメラーゼによる複製に比べ、格段に「間違い」を起こしやすいことが知られている。(Steinhauer, D.A., Holland, J.J.: Annual Review of Microbiology, 41, 409-433 (1987); Gojobori, T., Yamaguchi, Y., Ikeo, K., Mizokami, M.: Japanese Journal of Genetics, 69, 481-488 (1994)) そのため、ウイルスが宿主細胞内で増殖すると、同時に新たな変異ウイルスが生まれてしまう。このような変異によりウイルスタンパク質の抗原性が少しずつ変化するため、インフルエンザウイルスは通常の免疫監視機構には検知されない場合が多く、毎年流行するのである。

【0006】

インフルエンザウイルスの変異には、前記の抗原性の連続変異 (Antigenic Drift) 以外に、宿主域の変異 (Antigenic Shift) (Suzuki, Y.: Progress in Lipid Research, 33, 429-457 (1994)) がある。インフルエンザウイルスの遺伝子は、一つにつながっておらず、分節状であるため、例えばヒトとカモのインフルエンザウイルスがブタに同時感染するとブタ体内で両者の遺伝子再集合体生まれ、全く新しい型 (抗原性) を有するウイルスが生まれることがある。そして、ヒトはこのようなウイルスに対する抗体を全く持たないために、ヒトが新しいウイルスに感染すると世界的に大流行する危険性がある。

【0007】

インフルエンザウイルスの感染は、ウイルス糖タンパク質であるヘマグルチニン (HA) が宿主細胞表面に存在するシアル酸含有糖鎖に結合することにより起こることが知られている (Suzuki, Y.: Progress in Lipid Research, 33, 429-457 (1994); Paulson, J.C.: The Receptors, Vol.2. Academic Press, Orlando, pp.131-219 (1985); Wiley, D.C. and Skehel, J.J.: Annual Review of Biochemistry, 56, 365-394 (1987))。そこで、従来、このシアル酸含有糖鎖が研究され、抗インフルエンザウイルス剤として各種のシアル酸含有糖鎖 (シアロ糖鎖) 化合物が報告されている。(Fujimoto, K., Hayashida, O., Aoyama, Y., Guo,

C.T., Hidari, K.I.P.J., and Suzuki, Y.: Chemistry Letter, 1259-1260 (1999); Suzuki, Y., Sato, K., Kiso, M., and Hasegawa, A.: Glycoconj J. 7, 349-54 (1990)) しかし、これらの化合物は、いずれも、一つの型のウィルスに対してのみ抗インフルエンザウィルス性を示すものであり、複数の型のウィルスが同時に流行するという現状においては、その有効性に限界があったのが実情である。

【0008】

また、インフルエンザウィルスの動物種間の伝播による宿主域の変異や宿主が持つインフルエンザウィルス抗体による抗原性の変異にも対応できる抗インフルエンザ剤は、これまでのところ開発されていない。

【0009】

したがって、この出願の発明は、以上のとおりの問題点を解決し、インフルエンザウィルスの宿主域の変異や抗原性の変異にも対応し、あらゆるヒトおよび動物由来のA型インフルエンザウィルスおよびB型インフルエンザウィルスの感染を阻止できる医薬品やウィルス除去用フィルター等の吸着剤として有用な物質を提供することを課題としている。

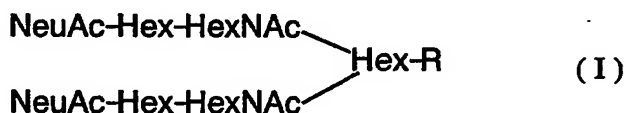
【0010】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、まず、第1には、次式(I)

【0011】

【化4】



【0012】

(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)

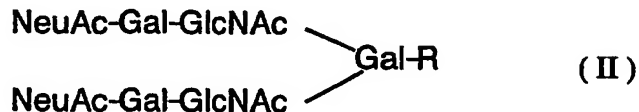
で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

【0013】

この出願の発明は、第2には、次式 (II)

【0014】

【化5】



【0015】

(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Galはガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)

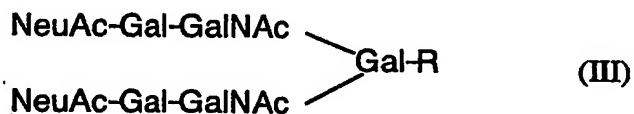
で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

【0016】

さらに、第3には、この出願の発明は、次式 (III)

【0017】

【化6】



【0018】

(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Galはガラクトース、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)

で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子を提供する。

【0019】

そして、この出願の発明は、第4には、少なくとも前記いずれかの新規分岐状

シアロ糖分子を有効成分として含有することを特徴とする抗ウィルス剤をも提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】

この出願の発明者らは、インフルエンザウィルスの遺伝子解析、および宿主への感染に必須なウィルス受容体となるシアロ糖鎖の調査を進め、インフルエンザウィルスがヒトから他の動物へ伝播する仕組みを明らかにしてきた (Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., and Kawaoka, Y.: *Journal of Virology*, 71, 3357-3362 (1997); Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, M., Nishimura, S.I., Yamagata, T., Ito, T., Kida, H., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y.: *FEBS Letters*, 404, 192-196 (1997); Ito, T., Suzuki, Y., Mitnaul, L., Vines, A., Kida, H., and Kawaoka, Y.: *Virology*, 227, 493-499 (1997); Suzuki, Y.: *Options for the control of influenza III.* (Elsevier Science B.V., Brown, L.E., Hampson, A.W., Webster, R.G., editors), 4443-4446 (1996))。そして、ヒト、ブタ、トリ、ウマから分離されるインフルエンザA型ウィルスおよびヒトインフルエンザB型ウィルスは、いずれも共通してシアル酸 (Sialic acid, SA) を含む糖鎖を特異的に認識結合すること、特に、シアリルラクト系I型およびII型糖鎖 (I型糖鎖: $SA\alpha 2-6(3)Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1-$; II型糖鎖: $SA\alpha 2-6(3)Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-$) と強く結合することを明らかにした。 (Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., et al.: *Virology*, 189, 121-131 (1992); 鈴木康夫: インフルエンザウィルスヘماغルチニンおよびシアリダーゼの細胞膜シアル酸含有糖鎖認識の機構、生化学、62, 231-260 (1990))

さらに、発明者らは、活性のあるシアロ糖鎖でも遊離オリゴ糖として存在する場合にはインフルエンザウィルスへの結合力は弱い、シアロ糖脂質、シアロ糖タンパク質などとして、脂質あるいはタンパク質に結合した糖鎖として存在する場合、さらに化学合成ポリマー上に上記シアロ糖鎖をクラスター形成して発現さ

せた場合には、飛躍的に高い結合性を表すことを見出した。(Fujimoto, K., Hayashida, O., Aoyama, Y., Guo, C.T., Hidari, K.I.P.J., and Suzuki, Y.: Chemistry Letter, 1259-1260 (1999); Akiko Tsuchida, Kazukiyo Kobayashi, Noritaka Matsubara, Tsukasa Muramatsu, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki: Glycconjugate J., 15, 1047-1054 (1998))

さらにまた、A型、B型のインフルエンザウィルスヘマグルチニンの分子進化は、受容体シアロ糖鎖末端のシアル酸結合様式 (SA-2-3Gal, SA2-6Gal) とシアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc) の認識の変化として現れることを見出した。(Suzuki, Y., Kato, H., Naeve, C.W., Webster, R.G.: Virology, 63, 4298-4302 (1989); Xu, G., Horiike, G., Suzuki, T., Miyamoto, D., Kumihashi, H., and Suzuki, Y.: Biochemical and biophysical research communications, 224, 815-818 (1996)) 例えば、ヒトからMDCK細胞を用いて分離されたA型 (H1, H3亜型) およびB型ウィルスは、SA2-6Gal結合 (以下2-6と記述) を認識するのに対して、カモおよびウマから分離されるウィルスはいずれもSA2-3Gal結合 (以下2-3と記述) に強い親和性を示し、2-6への結合は弱い。一方、ブタから分離されるウィルスは2-6への強い親和性を示すが、2-3にも結合できる。

【 0 0 2 1 】

そこで、インフルエンザウィルスの受容組織 (ヒト、ブタ、ウマは上気道粘膜細胞、カモは腸管粘膜細胞) におけるシアル酸の結合様式および分子種を調査したところ、ブタの上気道細胞にはヒト、カモウィルス両者に対する受容体シアロ糖鎖 (2,6-、2,3-の両者) が存在することが明らかになった。すなわち、ブタは自然界においてカモおよびヒトインフルエンザウィルスの中間宿主となり得ることが分子レベルで明らかになったのである。

【 0 0 2 2 】

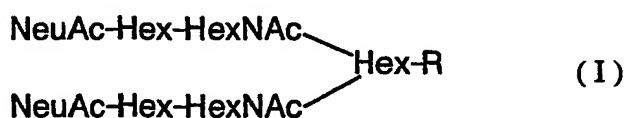
しかし、実際に宿主細胞の表面で発現されているシアロ糖鎖 (すなわち、特定のレセプター分子) の存在や構造はこれまで明らかにされていなかった。そこで、この出願の発明者らは、鋭意研究により、インフルエンザウィルス感染組織から各種のシアロ糖鎖を抽出し、それぞれのインフルエンザウィルスに対する結合性を調べ、本願発明にいたったものである。

【0023】

すなわち、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、次の化学式（I）

【0024】

【化7】



【0025】

（ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい）で表されるものである。このような化合物において、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、その種類はとくに限定されない。好ましくは、Hexはガラクトース（Gal）、HexNAcはガラクトサミン（GalNAc）またはグルコサミン（GlcNAc）である。

【0026】

また、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、Rが水素原子や置換基を有していてもよい炭化水素基である遊離オリゴ糖やその誘導体であってもよいし、Rが糖鎖、脂質、タンパク質あるいは合成高分子等であってもよい。前記のとおり、Rとして脂質、タンパク質、合成高分子等を有し、新規分岐状シアロ糖脂質、新規分岐状シアロ糖タンパク、高分子固定化新規分岐状シアロ糖などを形成している場合には、インフルエンザウィルスに対する結合性が高くなり、好ましい。また、Rの構造は、この発明の新規分岐状シアロ糖分子の用途に応じて適宜変更してもよい。

【0027】

この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、公知の多糖類の合成方法によって合成されるものであってもよいし、天然由来のものであってもよい。とくに孵化鶏卵しょう尿膜由来のものを単離して得られるものが例示される。

【0028】

この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、その分子中にすべての型（A型、B型、およびA型インフルエンザウィルスヘマグルチニン亜型）のウィルスが宿主細胞受容体に結合する上で必要な複数のシアロ糖鎖を併せ持つ。そのため、A型のインフルエンザウィルスおよびB型のインフルエンザウィルスのいずれに対しても有効に結合する。

【 0 0 2 9 】

したがって、この出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子は、インフルエンザウィルス感染を防止する各種の手段に適用できる。例えば、医薬品（抗ウィルス剤）の有効成分、マスクや空気清浄機等のフィルターにおけるウィルス吸着剤等の用途が挙げられる。例えば抗ウィルス剤として用いる場合には、どのような形態としてもよく、液剤、錠剤、粉末等の経口投与されるものや、点鼻薬、口腔スプレーなどのエアロゾル等として鼻腔や咽頭に直接適用するもの、経皮投与するもの等が例示される。また、フィルター等に充填する場合には、空気中からウィルスを除去し、拡散を防ぐことが可能となる。さらに、カーテン、壁紙などの家庭用品にこの出願の発明の新規分岐状シアロ糖分子を混合あるいは塗布すれば、ウィルスの除去、拡散防止効果を付与することができる。

【 0 0 3 0 】

この発明の新規分岐状シアロ糖分子は、インフルエンザウィルスに対して従来の直鎖状の糖鎖群と同等かそれ以上の結合性を有し、高い感染防止効果を発揮する。また、前記のとおり、あらゆるインフルエンザウィルスに対して高い結合性を有するために、複数種のインフルエンザが同時に流行したり、新たなインフルエンザウィルスの変異体が発生したりしても、十分な結合性を維持でき、抗ウィルス剤やウィルス吸着剤としての性能を発揮できる点で、従来の直鎖状の糖鎖群よりも有用性が高いといえる。

【 0 0 3 1 】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細に説明する。もちろん、この出願の発明は、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

【 0 0 3 2 】

【実施例】

＜実施例 1＞ インフルエンザウィルスレセプター候補分子の探索

インフルエンザウィルスのレセプターとなる分子を探索、同定するために、ウィルスの増殖に用いられる孵化鶏卵のしょう尿膜およびウィルスの分離や感染実験に用いられる犬の腎尿細管細胞（MDCK細胞）からA型およびB型のインフルエンザウィルスと反応する脂質性分子を単離することを試みた。

I. 実験方法

(1) 材料

インフルエンザウィルス株としては、次の表1に示すものを使用した。

【0033】

【表1】

ウィルス種	血清型	NeuAcへの結合特異性
A/PR/8/34	H1N1	$\alpha 2-6 \ll \alpha 2-3$
A/Aichi/2/68	H3N2	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$
A/Memphis/1/71	H3N2	$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
A/Duck/313/4	H5N3	$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$
A/Duck/92/1/76	H9N2	$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$
B/Lee/40		$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Gifu/2/73		$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$

【0034】

なお、表中、N-アセチルノイラミン酸への結合特性は、IIIに後述するTLC/virus-binding assayにより標準糖脂質（シアリルパラグロボシド）との反応性を調べた結果に基づく値である。また、TLC/virus-binding assayは、発明者らにより確立された方法である（文献）。

【0035】

抗インフルエンザウィルス抗体としては、次の表2に示すものを使用した。

【0036】

【表 2】

ウイルス種	一次抗体 ^{*1}	二次抗体 ^{*2}
A/PR/8/34	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Aichi/2/68	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Memphis/1/71	USA1 (x 500)	Protein A (x 1000)
A/Duck/313/4	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Duck/92/1/76	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
B/Lee/40	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)
B/Gifu/2/73	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)

*1:一次抗体は発明者らにより作製されたウサギポリクローナル抗体

*2:anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology社)、Protein A(Cappel社)より購入

【 0 0 3 7 】

(2) インフルエンザウイルスの精製

PBSで希釈 (A型インフルエンザウイルス: $2^{-3} \sim 4$; B型インフルエンザウイルス: $2^{-1} \sim 0$) したウイルス懸濁液を11日齢発育鶏卵のしょう尿腔に0.2 ml植種し、34℃で48時間培養した。

【 0 0 3 8 】

しょう尿液を回収した後、4℃、4000 rpm (HITACHI SCI 20B, RPR9ローター) で10分間遠心し、夾雑物を除去した。上清をさらに4℃、8000rpmで3時間遠心し、ペレットをPBSで懸濁して粗ウイルス液とした。次に50%グリセロール (WAKO) -PBSに粗ウイルス重層し、4℃、38000 rpm (HITACHI CP65 β , P40STローター) で2時間遠心した。再び得られたペレットをPBSで懸濁し、10-40% (w/v) ショ糖連続密度勾配遠心を4℃、20000 rpmで90分 (HITACHI CP65 β , P28Sローター) 行った。

【 0 0 3 9 】

ウイルスのバンドを回収し、4℃、8000rpm (HITACHI SCR 20B, RPR18ローター) で3時間遠心することにより精製ウイルスを得た。得られたウイルスはPBSで懸濁し、-80℃で保存した。

(3) HAUの測定

2^{10} 倍希釈した精製インフルエンザウイルス50 μ lをマイクロプレート (96U-bo

ttom wells, Falcon) 上に0.01%ゼラチン (nacalai tesque, Inc.) -PBS 50 μ lで倍々希釈した。0.5% (v/v) モルモット赤血球-PBSを50 μ l加え、4℃で2時間静置した後、赤血球の凝集を観察した。HAUはモルモット赤血球が凝集するために必要なウィルスの最高希釈倍数で示した。

(4) しょう尿膜からの反応性脂質の探索

11日齢発育鶏卵40個のしょう尿膜を回収し、PBSで洗浄した後、凍結乾燥 (EYELA FDU-830) した。乾燥重量1.81 gのしょう尿膜にMilliQ水15 mlを加え、ホモジナイズした。さらにCHCl₃/MeOH 60mlを加え、1時間抽出した後、抽出液をろ過し、エバポレーターで溶媒を留去した。MeOH 60mlを加え、バス式ソニケーター (SILENTSONIC, SHARP) にて超音波処理した後、0.1N NaOHにより37℃で一晩加水分解を行った。溶媒を留去した後、MilliQ水20 mlを加え、超音波処理し、透析 (透析膜: VISKASE SALES CORP) を行った。

【0040】

透析後、凍結乾燥したサンプルをCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (30/60/8, v/v/v) 20 mlに溶解させ、超音波処理し、DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech) はCHCl₃/MeOH/0.8 M NaOAc (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、CHCl₃/MeOH/MilliQ水 (30/60/8, v/v/v) で平衡化したものを用いた。Bed volume 10 mlのDEAE-Sephadex A-25にサンプルを導入し、CHCl₃/MeOH/MilliQ水 (30/60/8, v/v/v) 100 mlで中性脂質画分を溶出させた後、CHCl₃/MeOH/0.8M NaOAc (30/60/8, v/v/v) 100 mlで酸性脂質画分を溶出させた。これらの画分から溶媒を除去し、MilliQ水 10 mlを加え、超音波処理した後、透析を行った。

【0041】

透析後、さらに凍結乾燥したサンプルのうち酸性脂質画分の半量をCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (5/4/1, v/v/v) 0.75 mlに溶解し、予めCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (5/4/1, v/v/v) で平衡化し、Iatrobeads (bed volume 3 ml) (Iatron Laboratories, Inc.) に導入した。

【0042】

まず、CHCl₃/MeOH/MilliQ水 (5/4/1, v/v/v) 15mlを流しながら、1 mlずつ画

分を集めた。その後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 15 ml、 MeOH 15 mlを流した。これらの画分のうち目的糖脂質を含む画分を集め、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1, v/v) 1 mlに溶解し、後述のII(a)およびIIIのTLCプレートの二次元展開により分析を行った。

【0043】

予め $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) で平衡化したIatrobeds (bed volume 25 ml) に $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) で溶解したサンプル2.5 mlを投与した。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) で125 mlから $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 125 mlへ勾配をかけた溶媒で溶出し、2.5 mlずつフラクションコレクター (ADVANTEC, SF-3120) で分取した。これらのフラクションについて、A型 (ヒト、トリ) およびB型ウィルスとの反応性を後述のII(b)およびIIIの分析方法で調べた。

【0044】

結果が認められたフラクションについて、さらに精製するために、全量をHPTLC (MERCK, HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60) プレートに投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM } \text{MgCl}_2/15 \text{ M } \text{NH}_4\text{OH}$ (50/40/7/3, v/v/v/v) にて展開し、得られた4つのバンドをメス (KEISEI MEDICAL INDUSTRIAL CO., LTD) で掻き取った。掻き取ったバンドは、それぞれ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) 1 mlを加えて5分間超音波処理した後、パスツールで綿栓ろ過した。さらに綿栓に $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 2 mlを流して先のろ液と合わせた。この溶媒を留去した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/(1/1, \text{v/v})$ 100 μl を加え、後述のII(c)およびIIIの方法によりTLCプレートにて分析を行った。

(5) MDCK細胞からの反応性脂質の探索

MDCK細胞 (10 cm dish 25枚) をconfluentになるまで培養し、収集した。得られた細胞のペレットを凍結乾燥し (乾燥重量0.06 g)、 MilliQ 水 600 μl を加えた。さらに、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1, v/v) 6 mlを加え、1500 rpm (TOMY, LC-100) で5分間遠心し、得られた上清の溶媒を留去した。 MeOH 3 mlを加え、超音波処理した後、0.1 N NaOH で37℃で一晩加水分解を行った。溶媒を留去した後、 MilliQ 水 2.5 mlを加え、超音波処理し、透析を行った。

【0045】

透析後、凍結乾燥したサンプルを $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 20 mlに溶解させ、超音波処理し、DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。DEAE-Sephadex A-25は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$ (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) に置換したものを用了。Bed Volume 10 mlのDEAE-Sephadex A-25にサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 100 mlで中性脂質画分を溶出させた。その後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$ (30/60/8, v/v/v) 100 mlで酸性脂質画分を溶出させた。これらの画分の溶媒を留去し、MilliQ水2.5 mlを加えて超音波処理した後、透析を行った。透析後、凍結乾燥した酸性脂質画分を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1, v/v) 100 μl に溶解し、II(a)およびIIIのTLCプレートの二次元展開により分析を行った。

II. TLCの科学発色試薬による検出

(a) 二次元展開：プラスチックTLCプレート (MERCHEREY-NAGEL, Polygram Sil G) はアセトンで展開した後、得られた酸性脂質画分と標準糖脂質 (bovine brain total gangliosides) を投与した。このTLCプレートを $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\% \text{ HCOOH}$ (65/25/10, v/v/v) にて一次元で展開した後よく風乾し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5 \text{ N NH}_4\text{OH}$ で二次元展開を行った。プレートを風乾した後、orcinol- H_2SO_4 試薬 (1 % (w/v) orcinol/2N H_2SO_4) を噴霧して110℃に加熱し、糖の検出を行った。

【0046】

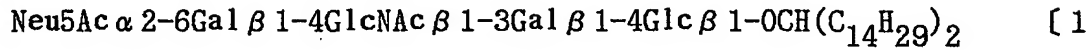
二次元展開の結果、ウィルスとの反応性が認められた画分については、さらに精製するために上記のIatrobedsカラムクロマトグラフィーで得られた画分と酸性脂質画分の残りの半量を合わせて再度Iatrobedsカラムクロマトグラフィーを行った。

(b) 一次展開：プラスチックTLCプレート上に得られた酸性脂質画分と標準糖脂質 (GSC-275, GSC-273, bovine brain total gangliosides) を投与した。このTLCプレートをアセトンで展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) にて展開した。プレートを風乾した後、orcinol- H_2SO_4 試薬を噴霧して110℃に加熱し、糖の検出を行った。

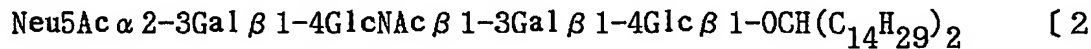
【 0 0 4 7 】

なお、GSC-275は、次の〔1〕に示す合成品の α 2,6-sialylparaglobosideであり、GSC-273は、〔2〕に示す合成品の α 2,3-sialylparaglobosideである。

【 0 0 4 8 】



]



]

(c) 一次展開：プラスチックTLCプレート上に得られた投資室画分と標準糖脂質（前記orcinol- H_2SO_4 試薬）を投与した。このTLCプレートをアセトンで展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2/15 \text{ M NH}_4\text{OH}$ (50/40/7/3, v/v/v/v) にて展開した。プレートを風乾後、orcinol- H_2SO_4 試薬を噴霧して110℃に加熱し、糖の検出を行った。

III. TLC/virus-binding assay

II(a)～(c)と同様に展開したTLCプレートを1% ovalbumin, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP)（東京化成）-PBS溶液（以下A液とする）で室温にて1時間振盪した。PBSで4℃、5分間、3回洗浄した後、 $\text{HAU}=2^7$ になるようにPBSで希釈したインフルエンザウィルス懸濁液3 mlを加え、4℃にて一晩振盪した。なお、virus(-)にはウィルス懸濁液の代わりにPBSを加えた。

【 0 0 4 9 】

これをPBSで4℃、5分間、3回洗浄し、3% PVP-PBS溶液（以下B液とする）で希釈した一次抗体溶液3 mlを加えて、4℃で2時間振盪した。このプレートをPBSで4℃、5分間、3回洗浄した後、B液で希釈した二次抗体溶液3 mlを加えて4℃で2時間振盪した。その後、PBSで4℃、5分間、3回洗浄し、発色基質溶液（0.1M citrate buffer pH 6.0, 5 ml; 0.11 mM 4-chloro-1-naphthol in CH_3CN , 100 μ l; 0.06 M DEPDA in CH_3CN , 100 μ l; 100 μ l; 30% H_2O_2 , 5 μ l) を加えて室温で振盪した。発色後、精製水で洗浄、風乾した。

IV. 結果

孵化鶏卵のしょう尿膜より脂質を抽出し、酸性脂質画分をTLCで二次元展開後

、糖の検出試薬であるorcinol- H_2SO_4 試薬で発色させた（図1 c）。同様にして展開したプレートをA/PR/8/34（図1 d）、A/Aichi/2/68（図1 e）、B/Lee/40（図1 f）、B/Gifu/2/73（図1 g）と反応させたところ、ウィルスに共通して反応する箇所が確認された。（図中矢印で表示）

移動度から、この共通して反応した画分は、シアリルパラグロボシドとは異なる分子である、より長い糖鎖構造を有する物質であることが示唆された。

【0050】

そこで、この画分をさらに精製するために、Iatrobeadsカラムクロマトグラフィーを行った。図2 aに得られたパターンを示した。

【0051】

1～7のフラクションについて、A型では、A/Memphis/1/71（図2 c）、A/PR/8/34（図2 d）、A/Aichi/2/68（図2 e）、A/Duck/313/4（図2 f）、A/Duck/92/1/76（図2 g）、B型では、B/Lee/40（図2 h）を用いて反応性を検討した。

【0052】

Neu5Ac α 2-6Gal結合の糖鎖構造と強く反応するA/Memphis/1/71（図2 c）は、フラクション2～6と反応しており、フラクション2の矢印で示したバンドは非常にシャープであった。Neu5Ac α 2-6Gal結合の糖鎖構造と同程度に結合するA/Aichi/2/68（図2 e）もA/Memphis/1/71と同様にフラクション2の矢印で示したバンドと強く反応していた。このバンドは、A/Duck/313/4（図2 f）、A/Duck/92/1/76（図2 g）、B/Lee/40（図2 h）にも反応しており、ヒトA型およびB型インフルエンザウィルスに共通して反応するだけでなく、H5、H9のトリウィルスにも反応することが明らかになった。

【0053】

そこで、この反応性脂質をさらに精製するために、フラクション2についてHPTLCにて掻き取りを行ったところ、図3 aに示すようなパターンが得られた。このバンドは、A/Memphis/1/71（図3 b）、A/PR/8/34（図3 c）と反応することが確認された。

【0054】

一方、MDCK細胞からも同様にして、脂質を抽出し、酸性脂質画分をTLCで二次元展開した後、 $\text{orcinol-H}_2\text{SO}_4$ 試薬で発色させたところ、図4 aのようなパターンが得られた。同様にして展開したプレートをA/PR/8/34 (図4 c)、A/Aichi/2/68 (図4 d)、B/Lee/40 (図4 e)、B/Gifu/2/73 (図4 f) と反応させたところ、矢印で示した部分がすべてのウィルスに共通して反応することがわかった。

【0055】

この反応性脂質は、しょう尿膜で反応した画分 (図1) と同様の移動度であることが明らかとなった。

<実施例2>

実施例1より、孵化鶏卵のしょう尿膜、MDCK細胞中に含まれる特定の脂質性分子がA型およびB型のインフルエンザウィルスと反応することが確認された。この脂質性分子の構造や結合特異性を調べるために、さらに大きなスケールで単離、精製を行った。最終的に単離された脂質性分子のインフルエンザウィルスとの結合特異性を既にウィルスとの結合性が報告されている標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較検討した。

I. 実験方法

(1) 材料

インフルエンザウィルス株としては、次の表3に示すものを使用した。

【0056】

【表3】

ウィルス種	血清型	NeuAcへの結合特異性
A/PR/8/34	H1N1	$\alpha 2-6 \ll \alpha 2-3$
A/Aichi/2/68	H3N2	$\alpha 2-6 > \alpha 2-3$
A/Memphis/1/71	H3N2	$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Lee/40		$\alpha 2-6 \gg \alpha 2-3$
B/Gifu/2/73		$\alpha 2-6 \doteq \alpha 2-3$

【0057】

なお、表中N-アセチルノイラミン酸への結合特性は、実施例1に示したTLC/

virus-binding assayにより標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドとの反応性を調べた結果に基づく値である。

【 0 0 5 8 】

また、抗インフルエンザウイルス抗体としては、次の表4に示すものを使用した。

【 0 0 5 9 】

【表4】

ウイルス種	一次抗体	二次抗体
A/PR/8/34	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Aichi/2/68	anti-P-50 (x 1000)	Protein A (x 1000)
A/Memphis/1/71	USA1 (x 500)	Protein A (x 1000)
B/Lee/40	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)
B/Gifu/2/73	anti-B/Lee (x 4000)	anti-rabbit IgG-HRP (x 2000)

【 0 0 6 0 】

(2) しょう尿膜から目的脂質の精製

11日齢発育鶏卵1150個からしょう尿膜を採取し、PBSで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥重量67.7 gのしょう尿膜にアセトン800 mlを加え、10分間超音波処理を行った。ホモジナイザーにて粉碎した後、室温で3時間攪拌した。抽出液をろ過し、乾燥させた残渣にCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (5/5/1, v/v/v) 2750 mlを加え、10分間超音波処理を行った。一晩攪拌した後、ろ過した残渣にCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (30/60/8, v/v/v) 1200 mlを加え、2時間攪拌した。

【 0 0 6 1 】

さらに、ろ液を先のろ液と合わせてエバポレーターで溶媒を留去した。MeOH 300 mlを加え、超音波処理した後、最終濃度0.1 N NaOHとなるように調製し、37℃、3.5時間さらに室温で一晩加水分解を行った。最終濃度0.1 Nとなるように調製したAcOHで中和した後、溶媒を留去した。MilliQ水80 mlを加え、超音波処理した後、透析を行った。透析後、凍結乾燥したサンプルをCHCl₃/MeOH/MilliQ水 (30/60/8, v/v/v) 100 mlに溶解し超音波処理した後、ろ過した。残渣に再びCH

$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 100 mlを加え、同様の操作を2回行った。3回のろ液を合わせてDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーのサンプルとした。DEAE-Sephadex A-25は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.8 \text{ M NaOAc}$ (30/60/8, v/v/v) で予め活性化した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) で平衡化したものを用いた。

【 0 0 6 2 】

Bed volume 440 mlのDEAE-Sephadex A-25にサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 20 lで中性脂質画分を溶出させた。その後 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.05 \text{ M NaOAc}$ (30/60/8, v/v/v) 9 lを流してモノシアロ酸性脂質画分とした。

(Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., et al.: Virology, 189, 121-131 (1992))

モノシアロ、ジシアロ以上の画分はMilliQ水150 mlを加えて透析を行った。透析後、凍結乾燥したジシアロ以上の画分を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (65/25/4, v/v/v) 10 mlに溶解した。ジシアロ以上の画分をさらに精製するため、Iatrobedsカラムクロマトグラフィーによりを行った。Iatrobedsは $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (65/25/4, v/v/v) で予め活性化したものを用いた。Bed volume 120 mlのIatrobedsにサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (65/25/4, v/v/v) 250 mlを流した。その際、フラクションコレクターにて2.5 mlずつ100本のフラクションをとり、HPTLCプレートで溶出画分の確認を行った。HPTLCプレートの展開溶媒は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) にて展開、確認を行った。また、ウィルスとの反応性を前記実施例1と同様の方法により調べ、反応性を有する画分のみを集めた。

【 0 0 6 3 】

これらの画分を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) 1 mlに溶解し、さらに精製するため再度Iatrobedsカラムクロマトグラフィーを行った。Iatrobedsは $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) で予め活性化したものを用いた。

【 0 0 6 4 】

Bed volume 25 mlのIatrobedsにサンプルを投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5

/4/1, v/v/v) 75 mlを流した。その際、フラクションコレクターにて0.25 mlずつ300本のフラクションをとった。これらのフラクションをHPTLCプレートに投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) にて展開、マッピングを行った。

【0065】

その結果、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (5/4/1, v/v/v) では目的の脂質性分子が溶出されなかったため、続いて $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (40/50/9, v/v/v) 25 mlを流し、0.25 mlずつ100本のフラクションをとった。

【0066】

これらのフラクションをHPTLCプレートに投与し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) にて20 cm展開、分かれた5つのバンドをメスで掻き取った。それぞれのバンドを $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 40 mlで抽出し、5分間超音波処理を行った。その後、シリカゲルを除くために綿栓ろ過し、溶媒を留去した。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2, v/v) 1 mlに溶解し、Iatrobeads カラムクロマトグラフィーを行なった。Iatrobeadsは $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2, v/v) で活性化し、Bed volume 1mlとした。サンプルを投与した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2, v/v) 15 ml、続いて $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) 20 mlを流した。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{MilliQ}$ 水 (30/60/8, v/v/v) により溶出された画分の溶媒を留去し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1, v/v) 200 μ lに溶解した。得られた画分をHPTLCプレートに投与し、展開溶媒 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) にて展開、orcinol- H_2SO_4 試薬で発色させた。

【0067】

これらの画分をAM1～5と名付け、最終精製標品とした。AM1～5について、A型およびB型インフルエンザウィルスとの結合特異性を標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較した。

II. 結果

ジシアロ以上の画分について1回目のIatrobeads カラムクロマトグラフィーを行った結果を図5に示した。

【0068】

溶出フラクションをTLCプレートにて展開、糖の検出試薬であるorcinol- H_2SO_4 試薬で発色させた。得られた1～7のフラクションについて、ウィルスとの反応

性を調べ、図6に結果を示した。

【0069】

A/Aichi/2/68 (図6 c) はフラクション4 および5 と強く反応し、A/Memphis/1/71 (図6 d) はフラクション4、5、6 と特に強く反応した。図5の矢印で示した部分がとくに強く反応することがわかったことから、この部分を多く含むフラクション4～6をプールし、2回目のIatrobeds カラムクロマトグラフィーを行った。

【0070】

得られたパターンを図7に示した。矢印で示した部分がとくに目的糖脂質を多く含んでいたことからフラクション5と6を集め、さらに精製した。

【0071】

なお、フラクション5および6は別々に精製し、以下フラクション6のみについてHPTLCプレートを用いて20 cm展開した。その結果、ブロードに見えていたバンドが少なくとも5つの糖脂質の混合物であることが明らかになった。そこで、これら5つのバンドを掻き取り、シリカゲルを除いた後、糖の発色を調べた。図8に得られたパターンを示した。これら5つのフラクションをAM1～5と名付け、最終精製標品とし、A型およびB型インフルエンザウィルスとの結合特異性を標準糖脂質であるシアリルパラグロボシドと比較した。

【0072】

AM1～5について、A型ではA/Aichi/2/68、A/PR/8/34、A/Memphis/1/71を用いて検討した。Neu5Ac α 2-3Gal および Neu5Ac α 2-6Gal 結合の糖鎖構造と同程度に結合するA/Aichi/2/6はAM1～5のすべての脂質性分子に反応し、AM1の矢印の移動度に観察されるバンド、およびAM3、4と強く反応した (図9 c)。

【0073】

なお、図9では、実施例3に後述する方法で質量分析を行うことができた。AM1、3、4については、標準糖脂質である α 2-3シアリルパラグロボシド、 α 2-6シアリルパラグロボシドと同量を投与した。標準糖脂質と比較するとAM1の矢印のバンドは、 α 2-3シアリルパラグロボシドより少し強く反応している。A

M3、4は、 α 2-6シアリルパラグロボシドとほぼ同等の強さで結合している。

【0074】

一方、Neu5Ac α 2-3Gal結合の糖鎖構造のみと結合するA/PR/8/34 (図9 d) はA/Aichi/2/68 (図9 c) と同様にAM1の矢印のバンドと強く反応した。したがって、これは、 α 2-3シアリルパラグロボシドと比較して非常に強いインフルエンザウィルス結合性を持つことが示された。また、A/Aichi/2/68 (図9 c) とは異なり、AM1から5の上の方の移動度に観察されるバンドとは反応しなかった。さらに、Neu5Ac α 2-6Gal結合の糖鎖構造のみと結合するA/Memphis/1/71 (図9 e) はA/Aichi/2/68 (図9 c) と似たようなパターンを示した。

【0075】

AM1はAichi/2/68、A/PR/8/34と同じように反応し、その反応性は、 α 2-6シアリルパラグロボシドより少し弱かった。AM3、4は、 α 2-6シアリルパラグロボシドと同程度か、もしくはそれ以上に反応していた。これらの結果から、AM1の矢印バンドは3つのウィルスに共通して強く反応しており、その反応性は標準糖脂質と同程度かもしくはそれより強いことが分かった。

【0076】

また、AM1から5について、B型インフルエンザウィルスとの反応性を調べた結果を図10に示した。Neu5Ac α 2-3GalおよびNeu5Ac α 2-6Gal結合の糖鎖構造と同程度に結合するB/Gifu/2/73 (図10 c) は、1～5のすべてのフラクションと反応した。A型の3種類のウィルスと同様に、AM1の矢印のバンドとも反応することが明らかになった。AM1は標準糖脂質の α 2-3および α 2-6シアリルパラグロボシドよりも強く反応していた。また、AM1～3の上の方の移動度に観察されるバンドとは反応しなかった。

<実施例3> 質量分析法によるAM1、3、4の構造解析

AM1～5のうち、質量分析が可能であったAM1、3、4の構造を解析するために、ESI (electrospray ionization) -FTMS (Fourier transform ion resonance mass spectrometer) 測定およびSIMS (secondary ion mass spectroscopy) -FTMS測定 (いずれもBioAPEX (Bruker instruments)) を行った。

I. 実験

(1) ESI-FTMS

AM1, 3, 4の各サンプルをメタノールに溶解 ($3 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) し、マイクロシリンジポンプを用いて $1 \mu\text{l}/\text{min}$ の流速にてスプレーを行った。cylinder、endo plate、capillary等のESI high voltage controllerやスプレーノズルを調製した後、negative-ion modeにて測定を行った。

(2) SIMS-FTMS

サンプルを $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, v/v) に溶解し、そのうち一定量 (300 pmol) を取り出してマトリックス (triethanolamine) と混合した後、accelerating voltage 10 kV 、negative-ion modeにて測定を行った。

II. 結果

分子量関連イオンピークと考えられる m/z 2195 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$ とそこからシアル酸 $[-\text{NeuAc}-\text{Na}]$ 1個がはずれた m/z 1882 $[\text{M}-\text{NeuAc}-\text{H}]^-$ が確認された。さらに、シアル酸関連ピークである m/z 290 $[\text{NeuAc}]^-$ 、 m/z 308 $[\text{NeuAc}]^-$ が低分子領域で認められた。また、2価イオン領域に m/z 1086 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ が認められ、ここから計算される分子量が先に述べた分子量関連イオンピークの質量数と一致することから、シアル酸が二個含まれている可能性が示唆された。

【0077】

この2個のシアル酸の結合に関して、GD1aおよびGD1bのスペクトルを参考に解析したところ、GD1bが有するNeuAc-NeuAcでは認められた m/z 581、 m/z 603がAM1では認められないことから、これらのシアル酸はそれぞれ単独で中性糖に結合していると考えられる。また、分子量関連イオンピーク m/z 2195はセラミド (LCB18:1-FA16:0)、中性糖が6個 (ヘキソースが4個、ヘキサミンが2個)、シアル酸が2個、Naが1個付加した組み合わせであることが示された。

【0078】

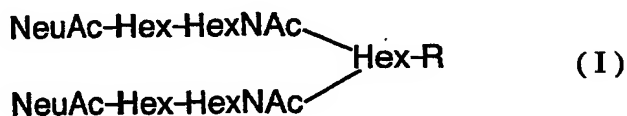
さらに、SIMS-FTMS測定からもセラミドに相当する m/z 536 (LCB18:1-FA16:0) が認められた。また、このセラミドにヘキソースが1個ずつ付加したピークに相当する m/z 698、 m/z 860、さらにヘキソサミンが付加したピークに相当する m/z 1063、ヘキソースが付加したピークに相当する m/z 1225が確認された。これよりAM1はラクトサミン骨格を有していることが示された。

【0079】

以上より、インフルエンザウィルスの宿主となる孵化鶏卵のしょう尿膜から、レセプター候補となる分子を単離することに成功した。また、構造解析よりこのレセプター分子は、次式 (I)

【0080】

【化8】



【0081】

(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)で表されることが確認された。

【0082】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明により、新規な分岐状シアロ糖分子が提供される。この化合物は、すべてのヒトおよび動物由来のA型インフルエンザウィルスおよびB型インフルエンザウィルスに結合できることから、インフルエンザウィルスの宿主域の変異や抗原性の変異に対応でき、あらゆるインフルエンザウィルスの感染を阻止できる医薬品やウィルス除去用フィルター等の吸着剤として有用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】

この出願の発明の実施例において、インフルエンザA型ウィルスおよびインフルエンザB型ウィルスの孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質との結合性試験(二次元展開)の結果を示す図である。(a : virus(-)、b : orcinol-H₂SO₄ 試薬により発色、c : A/PR/8/34との結合性、d : A/Aichi/2/68との結合性、e : B/Lee/40との結合性、f : B/Gifu/2/73との結合性; S : 標準糖脂質 = bovine

brain total gangliosides, S1: α 2-6シアリルパラグロボシド、S2: α 2-3シアリルパラグロボシド、1st:一次展開 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\%\text{HCOOH}$ (65/25/10, v/v/v))、2nd:二次展開 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\text{N NH}_4\text{OH}$ (5/4/1, v/v/v)) ; 矢印: インフルエンザウイルスに共通して反応した糖脂質)

【図2】

この出願の発明の実施例において、Iatrobeadsカラムクロマトグラフィーにより精製した孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザA型ウイルスおよびインフルエンザB型ウイルスの結合性試験 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v)) の結果を示す図である。(a: virus(-)、b: orcinol- H_2SO_4 試薬により発色、c: A/Memphis/1/71、d: A/PR/8/34との結合性、e: A/Aichi/2/68との結合性、f: A/Duck/313/4、g: A/Duck/92/1/76、h: B/Lee/40との結合性; S: 標準糖脂質=bovine brain total gangliosides+GM3、S1: α 2-6シアリルパラグロボシド、S2: α 2-3シアリルパラグロボシド; 1~7: フラクション; 矢印: 目的の糖脂質)

【図3】

この出願の発明の実施例において、孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザA型ウイルスの結合性試験 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2/15\text{M NH}_4\text{OH}$ (50/40/7/3, v/v/v)) の結果を示す図である。(a: orcinol- H_2SO_4 試薬により発色、b: A/Memphis/1/71、c: A/PR/8/34との結合性; S1: α 2-6シアリルパラグロボシド、S2: α 2-3シアリルパラグロボシド、AM: 孵化鶏卵しょう尿膜由来の精製糖脂質)

【図4】

この出願の発明の実施例において、MDCK細胞由来の酸性糖脂質とインフルエンザA型ウイルスおよびインフルエンザB型ウイルスの結合性試験 (二次元展開) の結果を示す図である。(a: virus(-)、b: orcinol- H_2SO_4 試薬により発色、c: A/PR/8/34との結合性、d: A/Aichi/2/68との結合性、e: B/Lee/40との結合性、f: B/Gifu/2/73との結合性; S: 標準糖脂質=bovine brain total gangliosides、S1: α 2-6シアリルパラグロボシド、S2: α 2-3シアリルパラグロボシド、1st:一次展開 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/88\%\text{HCOOH}$ (65/25/10, v/v/v))、2nd:二次展開

($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\text{N NH}_4\text{OH}$ (5/4/1, v/v/v)) ; 矢印 : インフルエンザウイルスに共通して反応した糖脂質)

【図 5】

この出願の発明の実施例において、孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質の latrobeads カラムクロマトグラフィーの流出プロファイルを示す図である。(展開溶媒 : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) ; orcinol- H_2SO_4 試薬により発色) (矢印 : インフルエンザウイルスとの反応性を示した糖脂質)

【図 6】

この出願の発明の実施例において、latrobeads カラムクロマトグラフィーにより精製した孵化鶏卵しょう尿膜に由来する酸性糖脂質とインフルエンザ A 型ウイルスの結合性試験 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v)) の結果を示す図である。(a : virus(-)、b : orcinol- H_2SO_4 試薬により発色、c : A/Aichi/2/68 との結合性、d : A/Memphis/1/71 ; S1 : α 2-6 シアリルパラグロボシド、S2 : α 2-3 シアリルパラグロボシド ; 1 ~ 7 : フラクシオン)

【図 7】

この出願の発明の実施例において、プールされた糖脂質の latrobeads カラムクロマトグラフィーの流出プロファイルを示す図である。(展開溶媒 : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) ; orcinol- H_2SO_4 試薬により発色) (矢印 : インフルエンザウイルスとの反応性を示した糖脂質)

【図 8】

この出願の発明の実施例において、調製用 TLC により精製した糖脂質の TLC 結果を示す図である。(展開溶媒 : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{mM MgCl}_2$ (5/4/1, v/v/v) ; orcinol- H_2SO_4 試薬により発色) (S : bovine brain total gangliosides)

【図 9】

この出願の発明の実施例において、調製用 TLC により精製した孵化鶏卵しょう尿膜由来の糖脂質とインフルエンザ A 型ウイルスの結合性試験の結果を示す図である。(a : virus(-)、b : orcinol- H_2SO_4 試薬により発色、c : A/Aichi/2/68 との結合性、d : A/PR/8/34 との結合性、e : A/Memphis/1/71 との結合性 ; S1 : α 2-6 シアリルパラグロボシド、S2 : α 2-3 シアリルパラグロボシド ; 1 ~ 5 : A

M番号；矢印：いずれのインフルエンザウイルスとも特異的に反応した糖脂質)

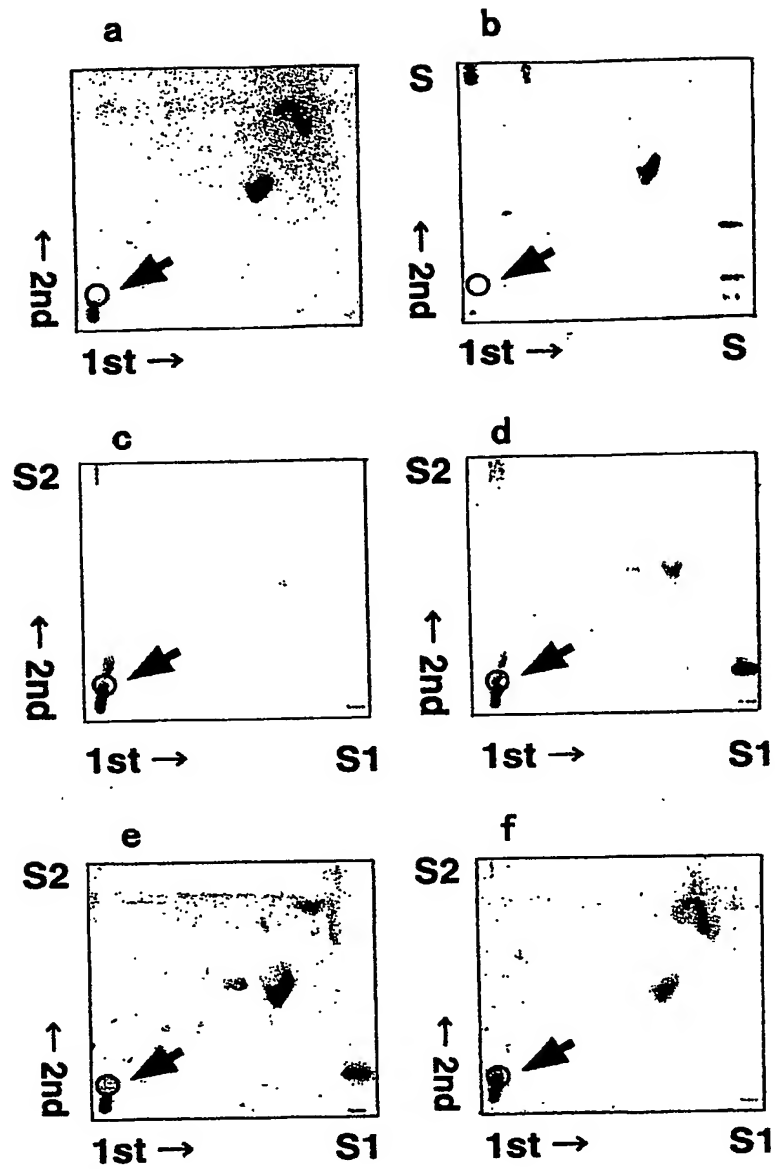
【図 1 0】

この出願の発明の実施例において、調製用TLCにより精製した孵化鶏卵しょう尿膜由来の糖脂質とB/Gifu/2/73の結合性試験の結果を示す図である。(a : virus(-)、b : orcinol-H₂SO₄試薬により発色、c : B/Gifu/2/73 ; S1 : α 2-6シアリルパラグロボシド、S2 : α 2-3シアリルパラグロボシド ; 1 ~ 5 : AM番号 ; 矢印 : B/Gifu/2/73と特異的に反応した糖脂質)

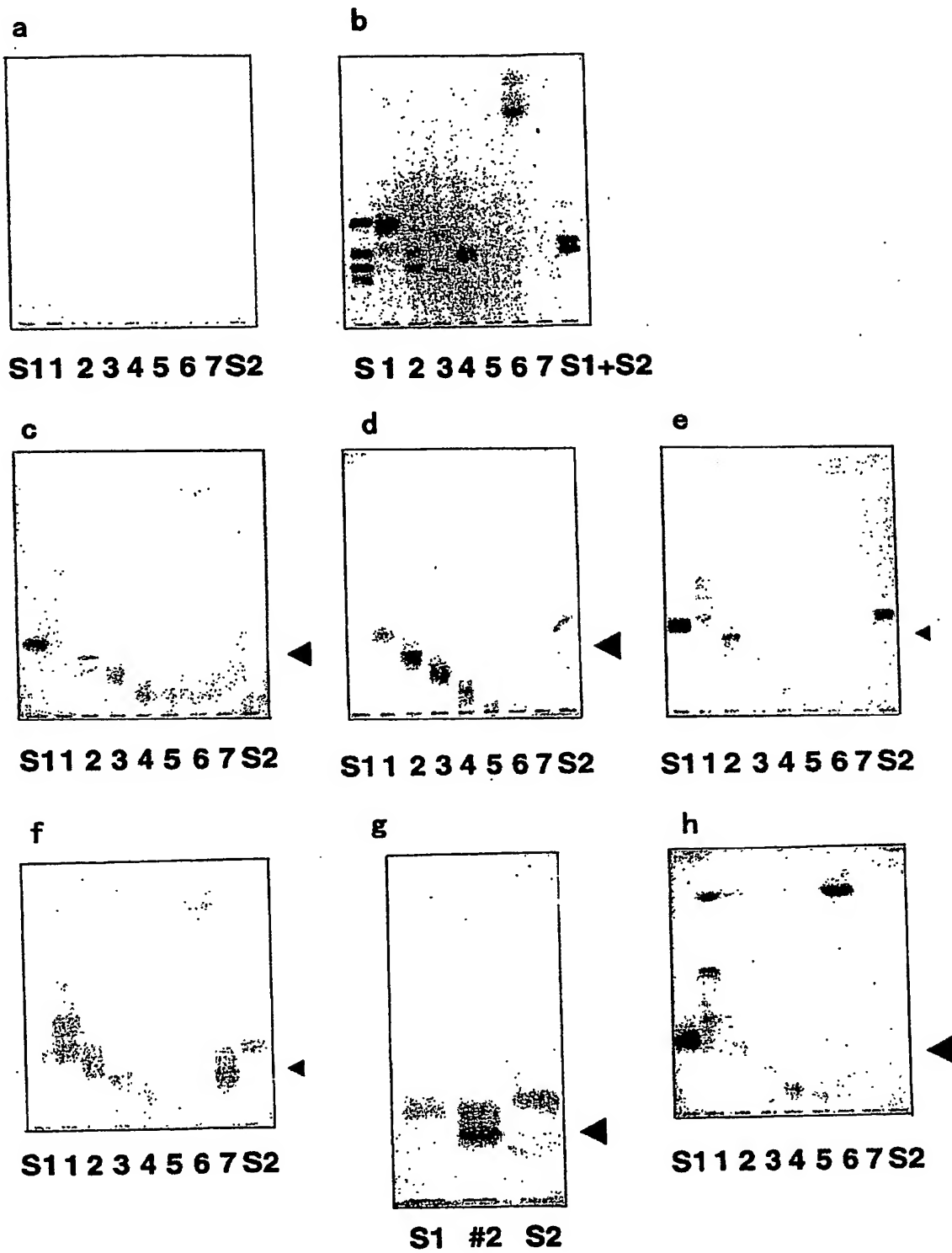
【書類名】

図面

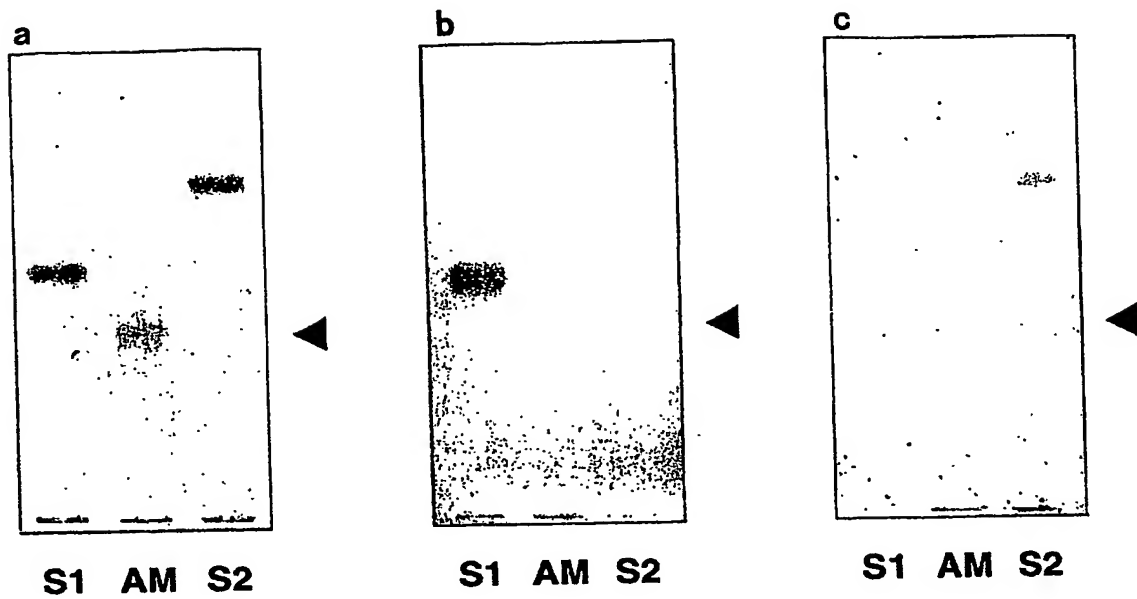
【図1】



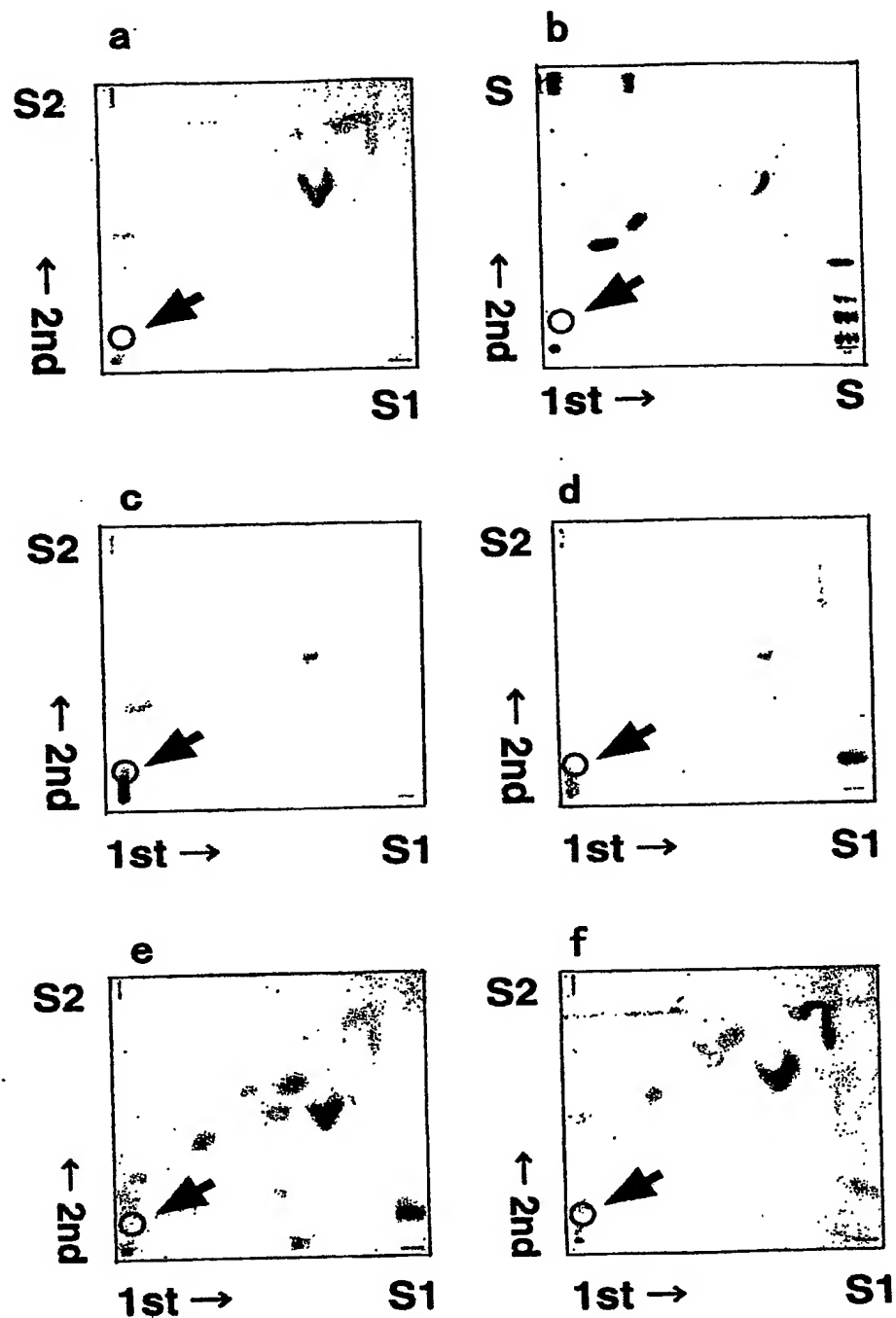
【図2】



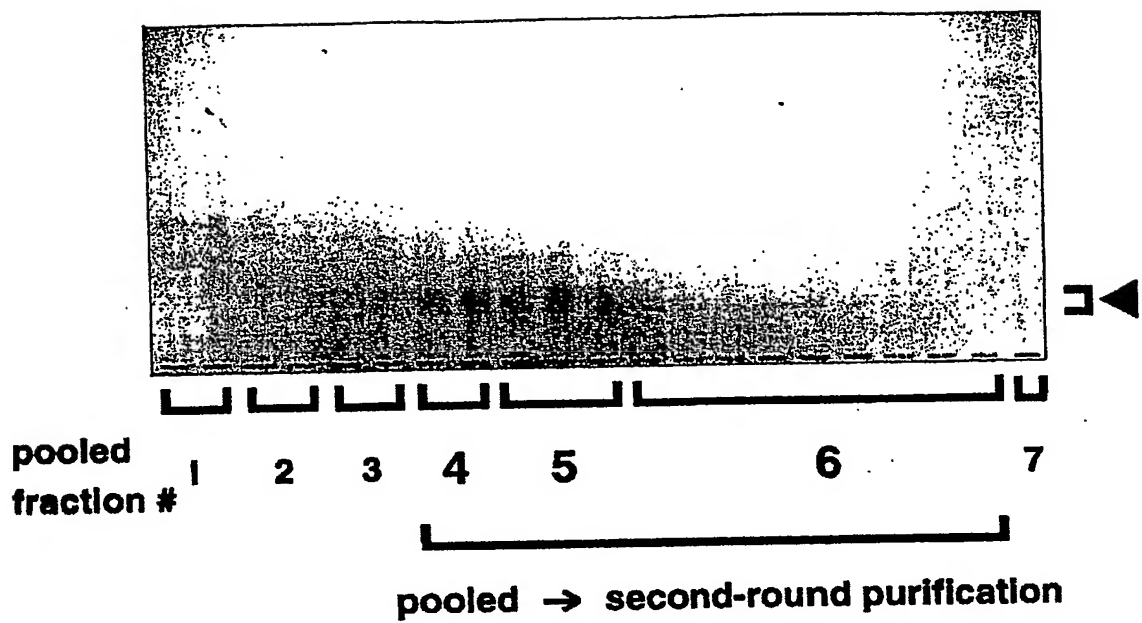
【図3】



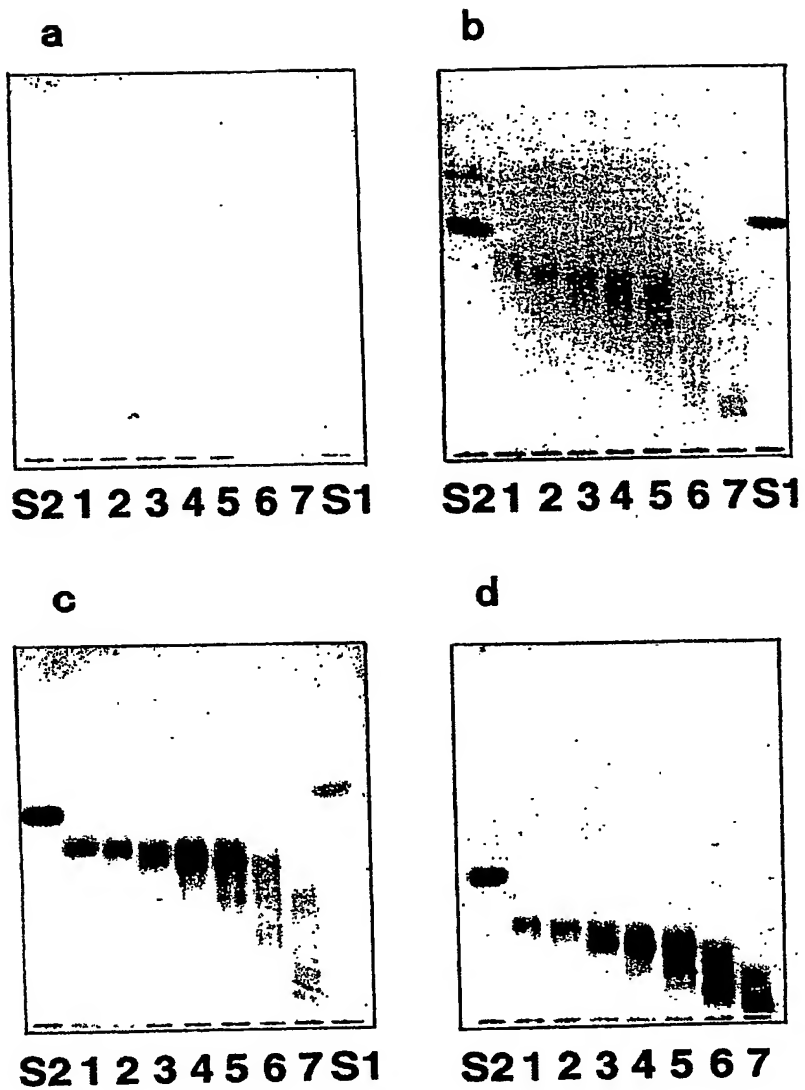
【図4】



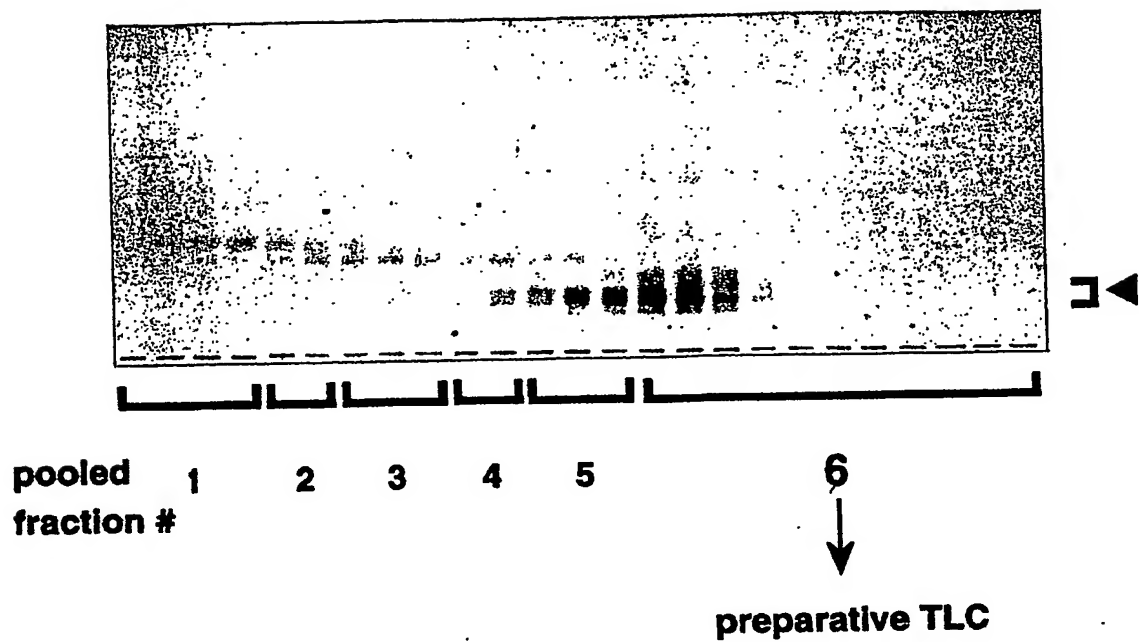
【図 5】



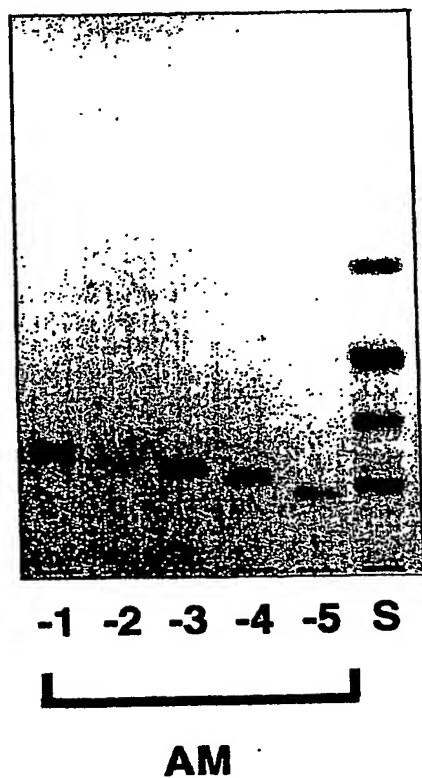
【図6】



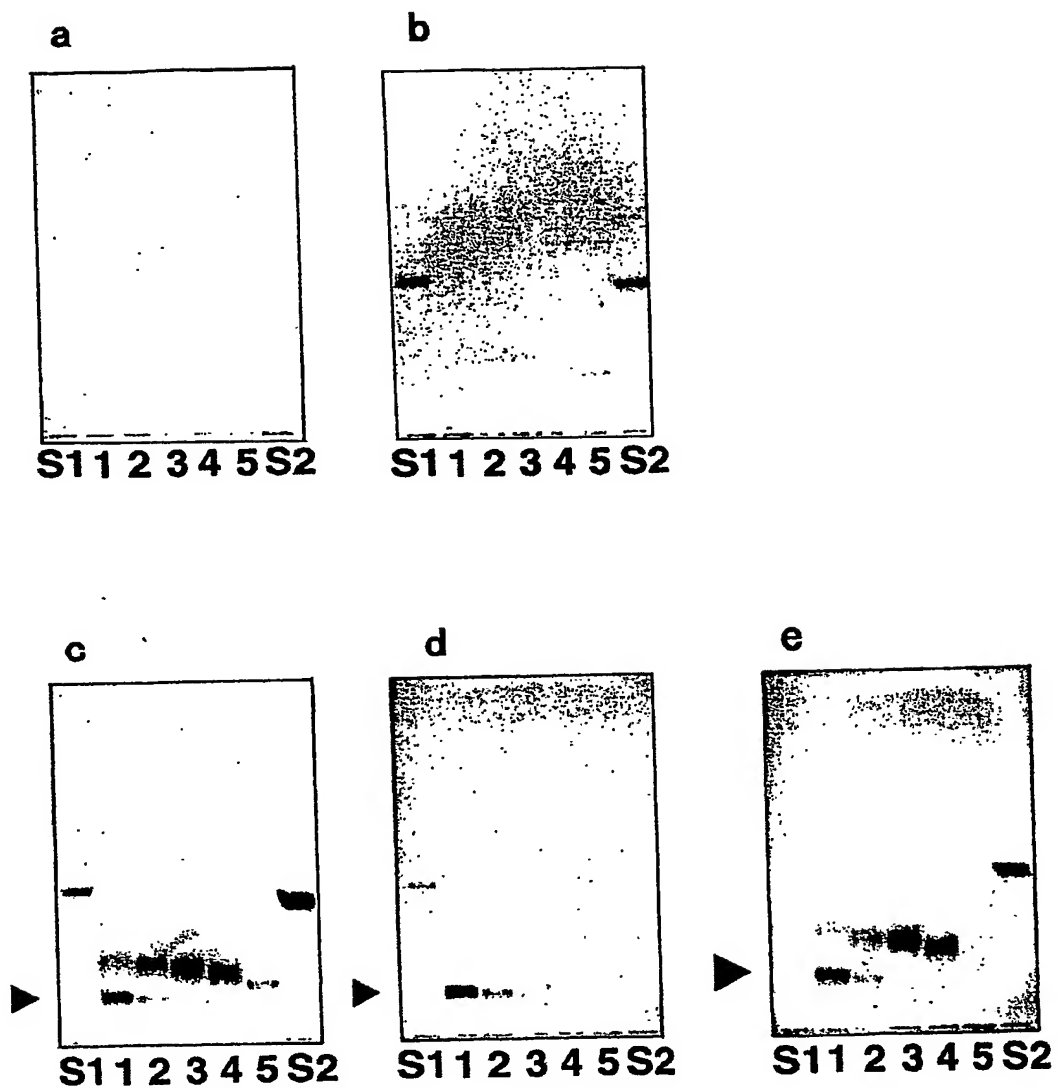
【図 7】



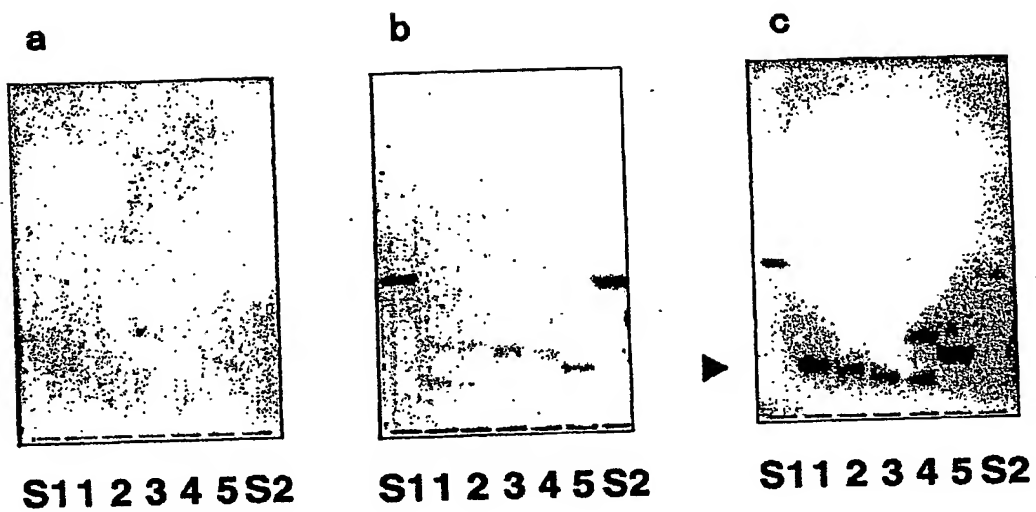
【図 8】



【図9】



【図10】



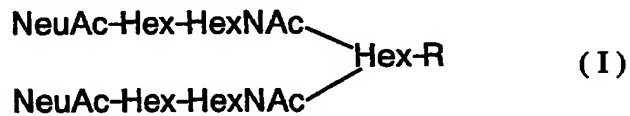
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インフルエンザウィルスの宿主域の変異や抗原性の変異にも対応し、あらゆるヒトおよび動物由来のA型インフルエンザウィルスおよびB型インフルエンザウィルスの感染を阻止できる医薬品やウィルス除去用フィルター等の吸着剤として有用な物質を提供する。

【解決手段】 次式 (I)

【化 1】



(ただし、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸、Hexはヘキソース、HexNAcはN-アセチルヘキソサミンを表し、Rは水素原子、炭化水素鎖、糖鎖、脂質、タンパク質、合成高分子から選択される基質であり、Rは置換基を有していてもよい)で表されることを特徴とする新規分岐状シアロ糖分子とする。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.